

# ESTROGEN RECEPTOR GENE AND ITS UTILIZATION

Publication number: JP2000201688

Publication date: 2000-07-25

Inventor: OSHITA HIROBUMI; JO MEIKYOKU

Applicant: SUMITOMO CHEMICAL CO

Classification:

- international: **C12N15/09; C07K14/72; C12N5/10; C12N15/00; C12P21/02; C12Q1/02; C12R1/91; C12N15/09; C07K14/435; C12N5/10; C12N15/00; C12P21/02; C12Q1/02; C12P21/02; (IPC1-7): C12N15/09; C07K14/72; C12N5/10; C12P21/02; C12Q1/02; C12N15/09; C12R1/91; C12P21/02; C12R1/91**

- European:

Application number: JP19990098787 19990406

Priority number(s): JP19990098787 19990406; JP19980319465 19981110

Report a data error here

## Abstract of JP2000201688

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain the subject new gene for production, etc., of an estrogen receptor useful for an examination system, etc., for measuring estrogenic action and comprising an estrogen receptor gene encoding a protein having a specific amino acid sequence. **SOLUTION:** This estrogen receptor gene encodes a protein having an amino acid sequence represented by the formula. The gene is useful for examination system, etc., for evaluating estrogen receptor activation ability of a chemical substance as a method for measuring estrogenic action of the chemical substance which is feared to get off human hormone balance and cause diseases. The gene is obtained by extracting RNA according to ordinary method from a killifish such as killifish for appreciation, reacting the RNA with a reverse transcriptase to synthesize cDNA, preparing cDNA library by using the cDNA and screening the cDNA library by hybridization method with a probe comprising a partial sequence.

```
Met Tyr Pro Gln Glu Ser Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala Ala Val Asp
  1              5              10              15
Leu Leu Gln Gly Thr Tyr Asp Tyr Ala Ala Pro Asn Pro Ala Thr Thr
              20              25              30
Pro Leu Tyr Ser Gln Ser Ser Thr Gly Tyr Tyr Ser Ala Pro Leu Glu
              35              40              45
|
|
|
|
|
|
|
Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ile Ala Pro Gly Ser Ile Ser Ala Ser Arg
530              535              540
Gly Arg Ile Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Phe Ala Pro Ser Val Leu
545              550              555              560
Gln Tyr Gly Gly Ser Arg Pro Asp Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp
              565              570              575
```

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-201688

(P2000-201688A)

(43) 公開日 平成12年7月25日 (2000.7.25)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/72		C 0 7 K 14/72	4 B 0 6 3
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/02	C 4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/02		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 5
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 N 5/00	B 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平11-98787	(71) 出願人	000002093 住友化学工業株式会社 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号
(22) 出願日	平成11年4月6日 (1999.4.6)	(72) 発明者	大下 博文 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住化テ クノサービス株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願平10-319465	(72) 発明者	徐 明旭 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住化テ クノサービス株式会社内
(32) 優先日	平成10年11月10日 (1998.11.10)	(74) 代理人	100093285 弁理士 久保山 隆 (外1名)
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エストロジェンレセプター遺伝子およびその利用

(57) 【要約】

【課題】 化学物質のエストロジェン様作用を測定するための方法として、化学物質のエストロジェンレセプター活性化能を評価するための試験系を提供可能とすること。

【解決手段】 配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするエストロジェンレセプター遺伝子等。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするエストロジェンレセプター遺伝子。

【請求項2】 配列番号3で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするエストロジェンレセプター遺伝子。

【請求項3】 配列番号2で示される塩基配列を有するエストロジェンレセプター遺伝子。

【請求項4】 配列番号4で示される塩基配列からなるエストロジェンレセプター遺伝子。

【請求項5】 請求項1～4記載のエストロジェンレセプター遺伝子を含有するベクター。

【請求項6】 エストロジェンレセプター遺伝子に宿主細胞で機能可能なプロモーターが機能可能な形で結合されてなる請求項5記載のベクター。

【請求項7】 請求項1～4記載のエストロジェンレセプター遺伝子が宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項8】 請求項5または6記載のベクターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項9】 宿主細胞が動物細胞である請求項7または8記載の形質転換体。

【請求項10】 請求項7～9記載の形質転換体を培養してエストロジェンレセプターを産生させ、これを回収することを特徴とするエストロジェンレセプターの製造方法。

【請求項11】 配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するエストロジェンレセプター。

【請求項12】 化学物質のエストロジェンレセプター活性化能を評価するためのレポーターアッセイにおいて、エストロジェン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子と請求項1～4記載のエストロジェンレセプター遺伝子とがエストロジェンレセプター非内在性宿主細胞に導入されてなる形質転換体に、化学物質を作用させることを特徴とする化学物質のエストロジェンレセプター活性化能の評価方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、エストロジェンレセプター遺伝子およびその利用に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 近年、環境中の幾つかの化学物質がエストロジェン様作用を示すことが報告されている。かかる化学物質の作用はヒトのホルモンバランスを崩し、疾患の原因となることが危惧されることから、化学物質の安全性評価の一環として化学物質のエストロジェン様作用を測定する試みがなされている。エストロジェンの作用機序として、エストロジェンがエストロジェンの標的細胞に存在するエストロジェンレセプターに結合すると、該レセプターは活

性化され、染色体上のエストロジェン応答配列に結合して該配列の下流に在する遺伝子の発現を促進する。そこで、化学物質のエストロジェン様作用を測定するための方法として、化学物質のエストロジェンレセプター活性化能を評価するための試験系の開発が切望されている。

【0003】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、かかる状況の下、鋭意検討した結果、水生動物のモデル動物であるメダカのエストロジェンレセプターをコードする遺伝子を見出し、本発明に至った。即ち、本発明は、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするエストロジェンレセプター遺伝子（以下、本発明遺伝子と記す。）、配列番号3で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする該遺伝子、配列番号2で示される塩基配列を有する該遺伝子、配列番号4で示される塩基配列からなる該遺伝子、該遺伝子を含有するベクター（以下、本発明ベクターと記す。）、該遺伝子が宿主細胞に導入されてなる形質転換体（以下、本発明形質転換体と記す。）、該形質転換体を培養してエストロジェンレセプターを産生させ、これを回収することを特徴とするエストロジェンレセプターの製造方法、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するエストロジェンレセプター、化学物質のエストロジェンレセプター活性化能を評価するためのレポーターアッセイにおいて、エストロジェン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子と本発明遺伝子とがエストロジェンレセプター非内在性宿主細胞に導入されてなる形質転換体に、化学物質を作用させることを特徴とする化学物質のエストロジェンレセプター活性化能の評価方法、を提供するものである。

【0004】

【発明の実施の形態】 以下、本発明について詳細に説明する。本発明遺伝子は、例えば、ヒメダカ等のメダカから、J.Sambrook, E.F.Frisch, T.Maniatis著；モレキュラー クローニング第2版（Molecular Cloning 2nd edition）、コールドスプリング ハーバー ラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）発行、1989年等に記載の遺伝子工学的的方法に準じて取得することができる。具体的には、まず、ヒメダカ等のメダカからRNAを調製する。例えば、ヒメダカの内臓を塩酸グアニジンやグアニジンチオシアネート等の強力な蛋白質変性剤を含む溶液中で粉碎し、さらに該粉碎物にフェノール、クロロホルム等を加えることにより蛋白質を変性させる。変性蛋白質を遠心分離等により除去した後、回収された可溶性画分から、塩酸グアニジン／フェノール法、SDS－フェノール法、グアニジンチオシアネート／CsCl法等の方法により全RNAを抽出する。なお、これらの方法に基づいた市販のRNA調製用キットとしては、例えばISOGEN（ニッポンジーン製）がある。得られた全RNAを鋳型として使用し、該RNAにオリゴdTプラ

イマーをアニールさせた後に逆転写酵素を作用させることにより一本鎖cDNAを合成し、次いで、該一本鎖cDNAに大腸菌RNaseHおよび大腸菌のDNAポリメラーゼIを作用させて二本鎖のcDNAを合成する。更に該cDNAの両末端をT4DNAポリメラーゼにより平滑化する。得られたcDNAはフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿等の通常の方法により精製し、回収する。なお、これらの方法に基づいた市販のcDNA合成用キットとしては、例えばcDNA合成システムプラス（アマシャム社製）がある。このようにして得られたcDNAを例えば、プラスミドpUC118やファージλgt11などのベクターにリガーゼを用いて挿入することによりcDNAライブラリーを作製する。次に、このようなcDNAライブラリーから、例えば、配列番号2で示される塩基配列の部分塩基配列を有するDNA断片をプローブとして用いるハイブリダイゼーション法や、配列番号2で示される塩基配列の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるPCR法により、本発明遺伝子を取得することができる。また、上記のようにして調製された全RNAを鋳型に使用して逆転写反応を行なった後、得られたDNAを鋳型にしてPCRを行なうことにより（RT-PCR法）本発明遺伝子を取得することもできる。上記のPCR法またはRT-PCR法においてPCRにより本発明遺伝子を増幅する際に用いるプライマーとしては、例えば、20bpから40bp程度の長さでかつGまたはC塩基の割合が40%から70%程度の塩基配列を、配列番号2で示される塩基配列の5'末端領域および3'末端領域からそれぞれ選択し、該塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成するとよい。具体的には、例えば、フォワードプライマーの塩基配列としては5'-ATG TAC CCT GAA GAG AGC CGG G-3'や5'-AAG CTTCAT GAG TAA GAG ACA GAG C-3'があげられ、リバースプライマーの塩基配列としては5'-TCA GTC TTG AAG GGC CGG GGA G-3'があげられる。このようにしてPCRで増幅された本発明遺伝子は、例えば、J.Sambrook, E.F.Frisch, T.Maniatis著；モレキュラー クローニング 第2版（Molecular Cloning 2nd edition）、コールドスプリング ハーバー ラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）発行、1989年等に記載の遺伝子工学的的方法に準じてベクターにクローニングすることができる。具体的には例えば、TAクローニングキット（Invitrogen社）やpBluescriptIII（Stratagene社）などの市販のプラスミドベクターを用いてクローニングすることができる。尚、本発明遺伝子は、配列番号2や配列番号4で示される塩基配列に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法（Hunkapiller, M. et al., Nature, 310, 105, 1984）等の通常の方法に準じて、核酸の化学合成を行うことにより調製することもできる。得られた本発明遺伝子の塩基配列は、Maxam Gilbert法（例えば、Maxam, A.M. & W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5

60, 1977 等に記載される)やSanger法（例えばSanger, F. & A.R.Coulson, J.Mol.Biol., 94, 441, 1975, Sanger, F. & Nicklen and A.R.Coulson., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 74, 5463, 1977等に記載される）に準じて解析することにより確認することができる。

【0005】このようにして取得される本発明遺伝子を、例えば、宿主細胞内で複製可能なDNAであって、宿主細胞からの単離、精製が可能であり、検出可能なマーカー遺伝子をもつベクターに、通常の遺伝子工学的手法を用いて組込むことにより本発明ベクターを構築することができる。本発明ベクターの構築に用いることができるベクターとしては、具体的には、微生物である大腸菌を宿主細胞とする場合、例えば、プラスミドpUC119（宝酒造（株）製）や、ファージミドpBluescriptII（ストラタジーン社製）等をあげることができ、酵母を宿主細胞とする場合は、プラスミドpACT2（Clontech社製）などをあげることができる。また、哺乳類動物細胞を宿主細胞とする場合は、pRC/RSV, pRC/CMV（Invitrogen社製）等のプラスミド、ウシバビローマウイルスプラスミドpBPV（ファルマシア社製）、EBウイルスプラスミドpCEP4（Invitrogen社製）等のウイルス由来の自律複製起点を含むベクター、ワクシニアウイルス等のウイルスなどをあげることができ、昆虫類動物細胞（以下、昆虫細胞と記す。）を宿主細胞とする場合は、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスをあげることができる。バキュロウイルスやワクシニアウイルス等のウイルスに本発明遺伝子を組込むには、使用しようとするウイルスのゲノムと相同な塩基配列を含有するトランスファーベクターを用いる。このようなトランスファーベクターの具体的例としては、Pharmlingen社から市販されているpVL1392, pVL1393（Smith, G.E., Summers M.D. et al.: Mol. Cell. Biol., 3: 2156-2165, 1983）、pSFB5（Funahashi, S. et al., J. Virol., 65: 5584-5588, 1991）などのプラスミドをあげることができる。本発明遺伝子を前記のようなトランスファーベクターに挿入し、該トランスファーベクターとウイルスゲノムとを同時に宿主細胞に導入すると、トランスファーベクターとウイルスゲノムとの間で相同組換えが起こり、本発明遺伝子がゲノム上に組み込まれたウイルスを得ることができる。ウイルスゲノムとしては、Baculovirus, Adenovirus, Vacciniavirusなどのゲノムを用いることができる。本発明遺伝子の上述に、宿主細胞で機能可能なプロモーターを機能可能な形で結合させ、これを上述のようなベクターに組み込むことにより、本発明遺伝子を宿主細胞で発現させることの可能な本発明ベクター（以下、本発明発現ベクターと記す。）を構築することができる。ここで、「機能可能な形で結合させる」とは、本発明遺伝子が導入される宿主細胞においてプロモーターの制御下に発現するように、該プロモーターと本発明遺伝子とを結合させることを意味する。使用するプロモーターは、形質転換する宿主細胞内でプロモータ

一活性を示すものであれば特に制限はなく、例えば、宿主細胞が動物細胞や分裂酵母である場合は、例えば、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、シミアンウイルス (SV40) の初期もしくは後期プロモーター、マウス乳頭腫ウイルス (MMTV) プロモーター、単純ヘルペスウイルス (HSV) のチミジinkinナーゼ (tk) 遺伝子プロモーター等をあげることができる。宿主細胞が出芽酵母である場合はADH1プロモーターなどをあげることができる。また、宿主細胞において機能するプロモーターをあらかじめ保有するベクターを使用する場合は、ベクター保有のプロモーターと本発明遺伝子とが機能可能な形で結合するように、該プロモーターの下流に本発明遺伝子を挿入すればよい。例えば、前述のプラスミドpRC/RSV, pRC/CMV等は、動物細胞で機能可能なプロモーターの下流にクローニング部位が設けられており、該クローニング部位に本発明遺伝子を挿入し動物細胞へ導入すれば、本発明遺伝子が発現する。これらのプラスミドにはあらかじめSV40の自律複製起点 (ori) が組み込まれているため、ori (-) のSV40ゲノムで形質転換された培養細胞、例えばC2OS細胞等に該プラスミドを導入すると、細胞内でプラスミドのコピー数が非常に増大し、結果として該プラスミドに組み込まれた本発明遺伝子を大量発現させることもできる。また、前述の酵母用プラスミドpACT2はADH1プロモーターを有しており、該プラスミドまたはその誘導体のADH1プロモーターの下流に本発明遺伝子を挿入すれば、本発明遺伝子を例えばCG1945 (Clontech社製) 等の出芽酵母内で大量発現させることが可能な本発明ベクターが構築できる。

【0006】上述のようにして構築された本発明ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明形質転換体を取得することができる。本発明ベクターを宿主細胞へ導入する方法は、形質転換される宿主細胞に応じて通常用いられる方法でよい。例えば、大腸菌を宿主細胞とする場合は、「モレキュラー・クローニング」(J. Sambrookら、コールド・スプリング・ハーバー、1989年)等に記載される塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法等を用いることができ、酵母菌を宿主細胞とする場合は、例えばリチウム法に基づくYeast transformation kit (Clontech社製) などを用いてベクターを導入することができる。また、哺乳類動物細胞や昆虫細胞等の動物細胞を宿主細胞とする場合は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、またはリポフェクション法等により該宿主細胞に本発明ベクターを導入することができる。尚、ウイルスをベクターに用いる場合は、上述のような一般的な遺伝子導入法によりウイルスゲノムを宿主細胞に導入できるほか、ウイルスゲノムを含有するウイルス粒子を宿主細胞へ感染させることによってウイルスゲノムを宿主細胞に導入することができる。

【0007】本発明形質転換体の選抜は、導入された本発明ベクターが有する検出マーカー遺伝子の性質に応じた方法を用いればよい。例えば、検出マーカー遺伝子が、細胞致死活性を示す薬剤に対する耐性遺伝子である場合には、該薬剤を添加した培地を用いて、本発明ベクターを導入した細胞を培養すればよい。このようにして用いることのできる薬剤耐性遺伝子と選抜薬剤との組み合わせとしては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子とネオマイシンとの組合せ、ハイグロマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシンとの組み合わせ、プラストサイジンS耐性遺伝子とプラストサイジンSとの組合せ等をあげることができる。また、検出マーカー遺伝子が、宿主細胞の栄養要求性を相補する遺伝子である場合には、該栄養素を含まない最少培地を用いて、本発明ベクターを導入した細胞を培養すればよい。さらに、本発明発現ベクターを導入した場合は、エストロジェン結合活性に基づく検出方法を用いることもできる。本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる本発明形質転換体を取得するには、例えば、本発明ベクターを制限酵素等で消化することにより直鎖上にした後、これを前述の方法で宿主細胞へ導入して該細胞を通常数週間培養し、導入された本発明ベクターにコードされる検出マーカーを指標にして目的とする形質転換体を選抜すればよい。例えば、上記のような選択薬剤に対する耐性遺伝子を検出マーカー遺伝子として持つ本発明ベクターを前述の方法で宿主細胞に導入し、選択薬剤を添加した培地で数週間以上該細胞を継代培養して、コロニー状に生き残った選択薬剤耐性クローンをピペットで吸い上げ純化することにより、本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる本発明形質転換体を取得することができる。該形質転換体は、凍結保存が可能であり必要に応じて起眠して使用することできるので、一過性の遺伝子導入株と比較して、形質転換体作製の手間を省くことができ、形質転換体の性能を一定に保つこともできる。

【0008】上述のようにして得られた本発明形質転換体を培養することにより本発明のエストロジェンレセプターを産生させることができる。例えば、本発明形質転換体が微生物である場合、該形質転換体は、一般微生物における通常の培養に使用される炭素源や窒素源、有機ないし無機塩等を適宜含む各種の培地を用いて培養すればよい。培養は、一般微生物における通常の方法に準じて行い、固体培養、液体培養 (試験管振とう式培養、往復式振とう培養、ジャーファーメンター (Jar Fermenter) 培養、タンク培養等) 等が可能である。培養温度は、微生物が生育する範囲で適宜変更でき、例えば、約15℃～約40℃の培養温度、約6～約8の培地pHで培養するとよい。培養時間は、種々の培養条件によって異なるが、通常約1～約5日間である。また、上記形質転換体が動物細胞である場合、一般の培養細胞における通常の培養に使用される培地を用いて培養すればよい。選

択薬剤を利用して当該形質転換体を選抜した場合は、対応する選択薬剤を共存させて培養するのが望ましい。哺乳類動物細胞の場合、例えば10v/v%となるようFBSを添加したDMEM培地等の培地を用いて、37℃、5v/v%CO<sub>2</sub>存在下等にて、培地を数日ごとに交換しながら培養する。細胞がコンフルエントになるまで増殖したら、0.25w/v%程度のトリプシンPBS溶液を用いて個々の細胞に分散させ、数倍に希釈して新しい培養容器に播種し培養を続ける。目的とする量まで細胞が増殖したら細胞を集める。昆虫細胞の場合も同様に、10v/v%FBSおよび2w/v%Yeastlateを含むGrace's medium等の昆虫細胞用培地を用いて25℃から35℃で継代培養する。ただし、Sf21細胞などの培養容器からはがれやすい細胞の場合は、トリプシン液ではなくピペッティングにより細胞を分散させ継代を行なう。また、Baculovirus等のウイルスベクターを含む形質転換体の場合は、細胞質効果により細胞が死滅する前、例えば培養開始から72時間目までに培養を終了することが好ましい。本発明形質転換体により産生されたエストロゲンレセプターの回収は、適宜、通常の単離、精製の方法を組み合わせれば良く、例えば、培養終了後、形質転換体の細胞を遠心分離等で集め、該細胞を通常のバッファー、例えば、20mMHEPES pH7, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mM PMSFからなるバッファー等に懸濁した後、ポリトロン、超音波、ダウンスホモジナイザー等を用いて細胞を破碎し、破碎液を数万xgで数十分から1時間程度超遠心分離し、上清画分を回収することにより、エストロゲンレセプターを含む画分を得ることができる。さらに、前記上清画分をイオン交換、疎水、ゲルろ過、アフィニティ等の各種クロマトグラフィーに供することにより、より精製されたエストロゲンレセプターを回収することもできる。この際、後述のエストロゲンレセプターが結合する塩基配列を含む15bpから200bp程度の長さのオリゴヌクレオチドをプローブとしたDNA結合アッセイなどにより、目的とするエストロゲンレセプターを含む画分を見分けることができる。このようにして製造された本発明のエストロゲンレセプターは、例えば、エストロゲンレセプターに対する化学物質の親和性を測定するためのラジオレセプターアッセイ等に用いることができる。

【0009】上述のようにして構築された本発明発現ベクターは、例えば、化学物質のエストロゲンレセプター活性化能を評価するためのレポーターアッセイに利用することができる。具体的には、エストロゲン応答配列を有しエストロゲンレセプターにより転写が制御される遺伝子、例えばピテロジェニン遺伝子の転写制御領域の下流にレポーター遺伝子を結合させたキメラ遺伝子、または、エストロゲン応答配列の下流に転写開始に必要な塩基配列とレポーター遺伝子とを結合させたキメラ遺伝子（以下、本キメラ遺伝子と記す。）を、細胞内でのエストロゲンレセプターの転写調節能をモニタ

ーするためのレポーター遺伝子として用いる。エストロゲン応答配列 (estrogen response element) とは、エストロゲンにより転写が制御される遺伝子のプロモーターの上流に存在し、エストロゲンレセプターによって認識される塩基配列を意味する。エストロゲンの結合したエストロゲンレセプターは活性化されてエストロゲン応答配列に結合することにより、該配列の下流にある遺伝子の転写を促進する。エストロゲン応答配列のコンセンサス配列としては、塩基配列 AGGTCAXXXTGACCT (Xは、A、G、C、またはTを意味する。) が一般に知られている。レポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ遺伝子、分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子、βガラクトシダーゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、成長ホルモン遺伝子などが利用できる。上述のように作製した本発明発現ベクターと、本キメラ遺伝子を組み込んだベクターとを、内在性のエストロゲンレセプターを産生していない宿主細胞、例えばHeLa細胞やNIH3T3細胞などに導入し形質転換体を取得する。この形質転換体をそのまま1日から数日間培養する間に、例えばエストロゲン様作用をもつ化学物質を培地中に加えて前記形質転換体に作用させる。該形質転換体が産生するエストロゲンレセプターが化学物質の結合により活性化された場合は、レポーター遺伝子のmRNAへの転写が促進され、ルシフェラーゼ酵素蛋白質が形質転換体の細胞内に蓄積する。この状態の形質転換体を破碎して細胞粗抽出物を調製し、レポーターの酵素活性等を指標にして細胞当たりのレポーター蛋白質の量を求める。例えば、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いた場合、前記細胞粗抽出物にルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを加えると発光し、発光量はルシフェラーゼ量に比例する。従って、この発光量をルミノメーター等の測定装置で測定することにより、ルシフェラーゼ遺伝子の発現量がわかり、よって、その際に添加されていた化学物質のエストロゲンレセプター活性化能を評価することができる。また、本発明発現ベクターと、本キメラ遺伝子が組み込まれたベクターとを同時に宿主細胞に導入して、本発明遺伝子および本キメラ遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる形質転換体を取得し、上記レポーターアッセイに用いてもよい。該形質転換体は凍結保存が可能であり必要に応じて起眠して使用することできるので、これを一旦取得すると、アッセイの度ごとにこれらの遺伝子を宿主細胞に導入して新たな形質転換体を取得する必要が無く、また、形質転換体の性能を一定に保つこともできることから、例えばハイスループットスクリーニング等の自動化された大規模スクリーニングを実施する際に有用である。

【0010】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によって限定されるもの

ではない。

#### 【0011】実施例1（本発明遺伝子の取得）

餌（コイ稚魚用）に $\beta$ -エストラジオール（和光純薬工業株式会社製）10mg/lを10mg/g餌となるように添加し、これにアセトンを加えてよく混和した後、ヘアードライヤーの下でアセトン除去した。こうして得た処理餌を、約3ヶ月のヒメダカ雌10個体に3回/日の頻度で1日間飽食量与えた。 $\beta$ -エストラジオール投与24時間後に、これらのヒメダカから臓器を摘出し、直ちに組織1\*

XU1 : 5'-ATG TAC CCT GAA GAG AGC CGG G-3' (22mer, GC/AT = 13/9)

XU14 : 5'-TCA GTC TTG AAG GGC CGG GGA G-3' (22mer, GC/AT = 14/8)

次いで、前記RT-PCRで得られたDNA断片をpCR2.1 (TA cloningベクター) にサブクローニングして大腸菌DH5- $\alpha$ に導入し、プラスミドを調製した(pCR-ER)。pCR2.1の塩基配列に基づくプライマーおよび上記のプライマー (XU1, XU14)を用い、ABI sequence systemで、前記のpCR-ERにクローニングされたDNA断片の塩基配列を決定した。その結果、配列番号2で示される塩基配列が明らか※

XU36 : 5'-AAG CTT CAT GAG TAA GAG ACA GAG C-3' (25mer GC/AT = 11/14)

XU14 : 5'-TCA GTC TTG AAG GGC CGG GGA G-3' (22mer, GC/AT = 14/8)

次いで、前記RT-PCRで得られたDNA断片をpCR2.1 (TA cloningベクター) にサブクローニングして大腸菌DH5- $\alpha$ に導入し、プラスミドを調製した(pCR-ER2)。pCR2.1の塩基配列に基づくプライマーおよび上記のプライマー (XU36, XU14)を用い、ABI sequence systemで、前記のpCR-ER2にクローニングされたDNA断片の塩基配列を決定した。その結果、配列番号4で示される塩基配列が明らかとなった。

#### 【0012】実施例2（本発明遺伝子発現用ベクターの構築）

実施例1で得られたプラスミドpCR-ERからエストロゲンレセプター遺伝子をXba I とHind IIIで切り出し、同じ制限酵素で消化した発現ベクターpRc/RSVに組みこみ、エストロゲンレセプターを発現させるための発現★

オリゴヌクレオチド1:

5'-CCA AAG TCA GGT CAC AGT GAC CTG ATC AAA GGA AC-3'

オリゴヌクレオチド2:

5'-CTT TGA TCA GGT CAC TGT GAC CTG ACT TTG GGT TC-3

両オリゴヌクレオチドの末端をカイネーションによりリン酸化した。カイネーション反応液は、10 nmolのオリゴヌクレオチド1または10 nmolのオリゴヌクレオチド2、2、5 $\mu$ lの10 Xカイネーション バッファー、1 $\mu$ lの10 mMのATP、2.5 $\mu$ lのポリヌクレオチドキナーゼ

(宝酒造社製)を1.5 ml容チューブに採り、滅菌蒸留水を加え全量を50 $\mu$ lとして調製した。カイネーション反応は37℃で1時間行った。反応終了後、リン酸化したオリゴヌクレオチド1とオリゴヌクレオチド2をアニーリングさせ、2本鎖のEREを得た。アニーリング反応液は、リン酸化させたオリゴヌクレオチド1およびオリゴヌクレオチド2のそれぞれ20 $\mu$ lずつを、1.5 ml容チュ

\* gあたり10mlのトリゾール試薬を加えてホモジナイズした後、クロロホルムを加えて遠心分離した。水相を採取してイソプロパノールを加えRNAを沈澱させた。約0.3g約500 $\mu$ gのRNAが得られた。このようにして調製したRNA1 $\mu$ gを鋳型とし、ランダム9merプライマーを用い、予め30℃で10分間逆転写反応を行い、引き続き42℃で50分間逆転写反応を行った。続いて下記のプライマー (XU1とXU14)を用い PCR (30サイクル、94℃ 30sec-1min、50-60℃ 1-1.5min、72℃ 1-3min)を行った。

※となった。また、上記のようにして調製したRNA1 $\mu$ gを鋳型とし、ランダム9merプライマーを用い、予め30℃で10分間逆転写反応を行い、引き続き42℃で50分間逆転写反応を行った。続いて下記のプライマー (XU36とXU14)を用い PCR (30サイクル、94℃ 30sec-1min、50-60℃ 1-1.5min、72℃ 1-3min)を行った。

★ベクターRSV-ERを構築した。具体的な過程を図1に、発現ベクターRSV-ERの構造の詳細を図2示す。また、同様にして、実施例1で得られたプラスミドpCR-ER2からエストロゲンレセプター遺伝子をXba I とHind IIIで切り出し、同じ制限酵素で消化した発現ベクターpRc/RSVに組みこみ、エストロゲンレセプターを発現させるための発現ベクターRSV-ER2を構築した。

#### 【0013】実施例3（エストロゲンレセプターに応答するレポーター遺伝子を有するベクターの構築）

30 既知のセノプスのA2ピテロジェニン遺伝子 (GenBank Accession No. X00205) の5'末端領域のエストロゲン応答配列 (以下、EREと記す。) のコンセンサス配列をもとに、下記のオリゴヌクレオチド1およびオリゴヌクレオチド2を合成した。

ープに加え、95℃で5分間保温し、60℃、次いで37℃にてそれぞれ1時間保温した後、室温で約1時間放置した。反応終了後、10 $\mu$ lのアニーリング反応液に10 $\mu$ lのDNAリガーゼ (ライゲーションキット、宝酒造社製)を加え、2本鎖のERE断片を連結した。反応液をアガロースゲル電気泳動に供してDNA断片の長さを分析し、ERE断片が4個連結されたと判断されるDNA断片 (以下、4 X ERE断片と記す。) およびERE断片が5個連結されたと判断されるDNA断片 (以下、5 X ERE断片と記す。) をそれぞれ回収した。これらのDNA断片をプランティングキット (宝酒造社製)を用い、末端を平滑化した。一方、pBluescript (SK-)を制限酵素EcoR I (宝酒

造社製)で切断し、5'末端をアルカリフォスフェターゼ(宝酒造社製)で脱リン酸化した。前記のDNA断片(4 X ERE断片または5 X ERE断片)とpBluescript(SK-)とをそれぞれDNAライゲーションキットを用いて結合した。得られた反応液で大腸菌DH5 $\alpha$ のコンピテントセル(東洋紡社製)を形質転換してアンピシリン耐性となった株を選抜し、該アンピシリン耐性株からプラスミドDNAを調製し、塩基配列をABI PRISM<sup>TM</sup>377 DNA Sequence System(パーキンエルマー・ジャパン社製)で確認した。次に、HSV tKプロモーター配列を持つベクターpTK $\beta$ (クロンテック)を制限酵素Sal IおよびXho I(それぞれ宝酒造社とニッポンジーン社製)で切断した後アガロースゲル電気泳動で分析し、約1 kbpのtKプロモーター断片を得た。該断片をプランティングキットを用い、末端を平滑化した。一方、ルシフェラーゼ遺伝子を持つレポータープラスミドpGL-3(ピッカジーン)を制限酵素Sma I(宝酒造社製)で切断し、5'末端をアルカリフォスフェターゼ(宝酒造社製)で脱リン酸化した。2つのDNA断片をDNAライゲーションキットを用いて結合した。得られた反応液で大腸菌DH5 $\alpha$ のコンピテントセル(東洋紡)を形質転換してアンピシリン耐性となった株を選抜し、該アンピシリン耐性株からプラスミドDNAを調製し、tKプロモーター挿入したレポータープラスミド(tK-pGL-3)を取得した。次に、上記の4 X ERE断片が挿入されたpBluescriptを制限酵素Kpn IおよびXba I(それぞれ宝酒造社とニッポンジーン社製)で切断し、アガロースゲル電気泳動で4 X ERE断片を回収した。一方、tK-pGL-3をKpn IおよびNhe I(いずれも宝酒造社製)で消化し、5'末端をアルカリフォスフェターゼ(宝酒造社製)で脱リン酸化した。このようにして調製された4 X ERE断片とtK-pGL-3とをDNAライゲーションキットを用いて結合した。得られた反応液で大腸菌DH5 $\alpha$ 株のコンピテントセル(東洋紡)を形質転換してアンピシリン耐性となった株を選抜し、該アンピシリン耐性株からプラスミドDNAを調製し、4 X ERE断片およびtKプロモーター断片を保有するレポータープラスミド(ERE-tK-pGL)を取得した。該プラスミドの構築の過程を図3に、該プラスミドの構造を図4に示す。また、同様に、上記の5 X ERE断片が挿入されたpBluescriptから5 X ERE断片を回収し、該断片と、Kpn IおよびNhe Iで消化されたtK-pGL-3とを結合させ、5 X ERE断片およびtKプロモーター断片を保有するレポータープラスミド(ERE5-tK-pGL)を取得した。

【0014】実施例4(プラスミドDNAの大量調製)  
実施例2で得られた発現ベクターRSV-ER、レポータープラスミドERE-tK-pGLおよびERE5-tK-pGL、ならびにコントロールレポータープラスミドであるpRL-tK(ピッカジーン)のDNAを以下の方法より大量に調製した。上記プラスミドを含む大腸菌をアンピシリン(終濃度50 $\mu$ g/ml)を含有LB培地3mlに植菌し、37 $^{\circ}$ Cで一晩振動培養した。そ

の培養液をアンピシリン(50 $\mu$ g/ml)を含むLB培地200mlに植菌し、一晩振動培養した。一晩培養後の菌体を5,000 rpm, 10分間, 4 $^{\circ}$ Cで遠心分離し(CR21、日立工機)、得られた沈澱を0.1 MのSTEバッファー60 mlに懸濁し、同条件で再度遠心分離した。沈澱を3 mlのsolution 1に懸濁し、1 mlのリゾチーム(20 mg/ml)を加え、室温で5分間放置した。引き続き10 mlのSolution 2を加え、氷上に10分間放置した後、7.5 mlのsolution 3を加え、氷上に15分間放置した。12,000 rpm, 20分, 4 $^{\circ}$ Cで遠心分離し、上清を50 mlチューブに移し、0.6容量のイソプロピルアルコールを加え、室温で15分間放置した。3,000 rpm, 10分間, 室温で遠心分離し(CR5DL、日立工機)、70%エタノールで洗浄し、乾燥させた。沈澱を4.2 mlのTEバッファーに溶かし、5 mg/ml Rnase溶液(ニッポンジーン)を28 $\mu$ l加え、50 $^{\circ}$ C, 30分間インキュベートした。2 mg/mlエチジウムブロマイド溶液400 $\mu$ lとCsCl(関東化学)4.6 gを加えた後、日立工機シールチューブに移し、55,000 rpm, 20 $^{\circ}$ C, 16時間遠心分離(SCP85H2、日立工機)した。スーパーコイルドプラスミドDNAのバンドを注射筒で抜き取り、55,000 rpm, 20 $^{\circ}$ C, 16時間再度遠心分離した。再びスーパーコイルドプラスミドDNAのバンドを注射筒で抜き取り、水飽和イソamilアルコールでエチジウムブロマイドを完全に除き、一晩5 mM STEバッファーに透析した後、試料として用いた。

#### 【0015】実施例5(細胞の培養)

不活化済み牛胎仔血清(GIBCO-BRL、米国)を活性炭-デキストランで処理し、細胞培養の培地作製に用いた。処理過程における各ステップは以下の通りであった。25 Mスクロース(和光純薬)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>(和光純薬)、10 mM HEPES(pH7.4)(同仁化学、熊本)1 L中にノーリットEXW(ナカライテスク)2.5 gとデキストランT-70(ファルマシアバイオテック、スウェーデン)0.25 gを懸濁し、4 $^{\circ}$ Cで終夜攪拌した。本懸濁液を12,000 rpmで10分遠心(CR21、日立工機)して活性炭を沈殿させた。これを不活化済み牛胎仔血清(GIBCO-BRL、米国)1 Lに懸濁し、4 $^{\circ}$ Cで終夜攪拌した。その後、12,000 rpmで10分遠心(CR21、日立工機)して活性炭を沈殿させ、取り除いた。以上の操作を2回繰り返した後、ザルトラプV500(0.20 $\mu$ m、ザルトリウス、独国)を用いてフィルター過したろ液を活性炭-デキストラン処理済みの牛胎仔血清とした。ヒト子宮癌細胞株HeLa(大日本製薬製)を、10% 活性炭-デキストラン処理済みの牛胎仔血清、0.03% L-グルタミン(日水製薬)および0.15% 炭酸水素ナトリウムを添加したイーグルMEM(日水製薬)培地を用いて10 cmの組織培養用ディッシュ(ファルコン)に培養した。細胞の継代・播種は培地を除去後、適量のPBS(-)(日水製薬)で接着した細胞を洗浄し、PBS(-)80 mlに5%トリプシン(DIFCO、米国)10 ml、0.2% EDTA $\cdot$ 3 Na(同仁化学)10 mlを添加した液を用いて細胞を剥離した。細胞の培養はすべて5% CO<sub>2</sub>および飽和湿度下、37 $^{\circ}$ C



でCO<sub>2</sub>インキュベータ（アステック）内で培養した。

#### 【0016】実施例6（レポーターアッセイ）

以下の操作を各条件ごとに4連で実験を行った。実施例5で培養した細胞の培地を除去し、PBS(-)で1回洗浄した。5%トリプシン（DIFCO, 米国）5 mlを加え、細胞を剥離した。細胞の計数した後24ウェルマルチウェルプレート（ファルコン）に播種した。細胞を1ウェルあたり40,000個のHeLa細胞を播種した。1ウェルあたり0.5mlの10% 活性炭—デキストラン処理済みの牛胎仔血清含有培地を添加し翌日まで培養した。トランスフェクションは1ウェルあたり0.25~1.0 μgのレセプター発現ベクター RSV-ER、0.1~0.5 μgのレポータープラスミドERE-tK-pGLまたはERE5-tK-pGL、および、0.05~0.1 μgのコントロールレポータープラスミドpRL-tKを、0.35 μl/ウェルのリポフェクチン(GIBCO-BRL)またはリポフェクタミン(GIBCO-BRL)を用いて、無血清培地中にて細胞に導入した。1ウェルあたりの培地量は200 μlとした。導入方法は添付説明書に従った。各細胞をトランスフェクション培地中で5時間培養後に10% 活性炭—デキストラン処理済みの牛胎仔血清含有培地に交換し、翌日まで培養を続けた。次いで、β-エストラジオール（和光純薬社製）をDMSO（関東化学）に溶解しイーグルMEM培地に溶かし、上述の細胞に添加した。β-エストラジオール終濃度は10 pMから100 nMの範囲とした。β-エストラジオール添加後の1ウェルあたりの培地量は1 mlとした。β-エストラジオールを添加してから約28時間培養後、培地を除去し、β-エストラジオールに曝露した細胞をPBS(-)で2回洗浄した。ピッカジーンデュアルキット（東洋インキ）中の細胞溶解剤を超純水で5倍希釈したものを1ウェルあたり50 μl添加し、室温で30分間放置して細胞を溶解した。方法はキットの添付説明書に従った。細胞溶解液10 μlを白色96ウェルマルチウェルプレート（燐光測定用、ベルトールド、ドイツ）に移し、キット中の発光基質2種（ルシフェリン、セランテラジン）を順次添加し、それぞれの発光量をルミノメーター（ベルトールド、LB96P）で測定した。はじめに添加する発光基質はレポータープラスミドERE-tK-pGL由来のホタルルシフェラーゼによる発光を測定するために用い、後で添加する発光基質はコントロールレポータープラスミドpRL-tK由来のシーパンジールルシフェラーゼによる発光を測定するために用いた。前者の発光量は化学物質が遺伝子の転写活性にあたえる影響を反映している。また、後者の発光量は内部標準として個々の実験データを補正するために用いる。

#### 【0017】実施例7（トランスフェクション条件の検討）

実施例6記載のレポーターアッセイにおいて、トランスフェクションの際の各ウェルへのプラスミドの添加量と、リポフェクチンまたはリポフェクタミンの添加量について検討した。まず、各ウェルに、プラスミド（tK-p

GL-3)を0.2 μgから1.2 μg、リポフェクチンまたはリポフェクタミンを0.2 μlから0.8 μlの範囲で添加してトランスフェクションを行い、得られた細胞を培養して、実施例6記載の方法に準じてルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図5に示した。リポフェクチンを用いた場合には、リポフェクチン0.4 μlとプラスミド0.4 μgを加えたときに、リポフェクタミンを用いた場合は、リポフェクタミンを0.6 μlとプラスミド0.4 μg加えたときに、それぞれ最も高いルシフェラーゼ活性が認められた。次に、リポフェクチンまたはリポフェクタミン添加量について更に詳細に検討した。すなわち、各ウェルに加えるプラスミド量（0.4 μg）を固定し、リポフェクチンはウェル当たり0.3~0.55 μlの範囲で、とりポフェクタミンはウェル当たり0.4~0.9 μlの範囲で添加し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果を図6に示した。リポフェクチンを0.35 μl加えた場合、または、リポフェクタミンを0.6 μl加えた場合にそれぞれ最も高いルシフェラーゼ活性を認めた。この結果を基に、リポフェクチンとリポフェクタミンの添加量をそれぞれ0.35 μlと0.6 μlに固定して、再度プラスミドの添加量を詳細に検討した。その結果を図7に示した。プラスミドを0.4~0.6 μgを加えた場合に最も高いルシフェラーゼ活性が認められた。以上の結果を基に、レポーターアッセイにおける各ウェルに添加する最適なプラスミドの量を0.4 μg ~ 0.6 μg、リポフェクチンの量を0.35 μl、リポフェクタミンの量を0.6 μlと決定した。

#### 【0018】実施例8（β-エストラジオールによる反応性の確認）

実施例6記載の方法および実施例7で得られた最適条件下に、HeLa細胞におけるβ-エストラジオール（E<sub>2</sub>）のエストロジェンレセプター活性化能を測定した。ウェル内のβ-エストラジオールの終濃度が10pM から50 μMとなる条件でルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図8と9に示した。100pM以上でルシフェラーゼ活性の上昇を認め、1nMでの活性は最大に達した。β-エストラジオール50 μMでは活性の低下が認められたがこれは細胞毒性によるものであると思われた。

#### 【0019】実施例9（化学物質のエストロジェン様作用の測定）

実施例6の方法および実施例7の結果で得られた最適条件下に、HeLa細胞におけるビスフェノールA、p-ノニルフェノール、酢酸トリブチルすず、またはフタル酸ジ-2-エチルヘキシルのエストロジェンレセプター活性化能を測定した。アッセイにおける各被験化学物質の終濃度は10 pMから50 μMの範囲として実験を行った。各被験化学物質の溶解性を光学顕微鏡下、沈殿物あるいは浮遊物がないことを目視で確認した。また、被験化合物に替えてβ-エストラジオールを終濃度500pMとなるように添加した群を設定し、陽性対照とした。ビスフェノールAまたはノニルフェノールでは100nMで活性が上昇し

始め、10  $\mu$ Mでは活性化倍率は溶媒コントロール（DMSOのみ添加）の約5倍に上昇した（図10、11）。酢酸トリブチルすずまたはフタル酸ジ-2-エチルヘキシルでは活性の上昇は認められなかった（図12、13）。さらに上記4種について50  $\mu$ Mでの実験も行った。その結果を図14に示した。ビスフェノールAで更なる活性の上昇を認めた。ノニルフェノールにおいては細胞に対する毒性に起因すると思われる活性の低下が認められた。

\* 【配列表】

&lt;110&gt; Sumitomo Chemical Company Limited

&lt;120&gt; Estrogen receptor genes

&lt;130&gt; P150237

&lt;150&gt; JP 10/319465

&lt;151&gt; 1998-11-10

&lt;160&gt; 4

20

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 575

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Oryzias latipes

&lt;400&gt; 1

```

Met Tyr Pro Glu Glu Ser Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala Ala Val Asp
  1           5           10           15
Leu Leu Glu Gly Thr Tyr Asp Tyr Ala Ala Pro Asn Pro Ala Thr Thr
      20           25           30
Pro Leu Tyr Ser Gln Ser Ser Thr Gly Tyr Tyr Ser Ala Pro Leu Glu
      35           40           45
Thr Asn Gly Pro Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly
      50           55           60
Pro Thr Ser Pro Leu Val Phe Val Pro Ser Ser Pro Arg Leu Ser Pro
      65           70           75           80
Phe Met His Pro Pro Ser His His Tyr Leu Glu Thr Thr Ser Thr Pro
      85           90           95
Val Tyr Arg Ser Ser His Gln Gly Ala Ser Arg Glu Asp Gln Cys Gly
      100           105           110
Ser Arg Glu Asp Thr Cys Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ala Gly Ala Gly
      115           120           125
Ala Gly Gly Phe Glu Met Ala Lys Asp Thr Arg Phe Cys Ala Val Cys
      130           135           140
Ser Asp Tyr Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly
      145           150           155           160
Cys Lys Ala Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met
      165           170           175
Cys Pro Ala Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg Asn Arg Arg Lys Gly
      180           185           190

```

\* 【0020】 参考例1（他の細胞用いたアッセイ）

他の種類の培養細胞を選び、実施例5～9と同様の実験を行う。

【0021】

【発明の効果】メダカエストロゲンレセプターをコードする遺伝子、および、化学物質の該レセプター活性化能を評価するための試験系等が提供可能となる。

【0022】

17										18									
Cys	Gln	Ala	Cys	Arg	Leu	Arg	Lys	Cys	Tyr	Glu	Val	Gly	Met	Met	Lys				
	195						200					205							
Gly	Gly	Val	Arg	Lys	Asp	Arg	Ile	Arg	Ile	Leu	Arg	Arg	Asp	Lys	Arg				
	210						215					220							
Arg	Thr	Gly	Val	Gly	Asp	Gly	Asp	Lys	Val	Val	Lys	Gly	Gln	Glu	His				
225					230						235				240				
Lys	Thr	Val	His	Tyr	Asp	Gly	Arg	Lys	Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	Gly	Gly				
					245					250					255				
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Arg	Leu	Ser	Val	Thr	Ser	Ile	Pro	Pro	Glu				
					260				265				270						
Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Gln	Gly	Ala	Glu	Pro	Pro	Ile	Leu	Cys	Ser				
					275				280				285						
Arg	Gln	Lys	Leu	Ser	Arg	Pro	Tyr	Thr	Glu	Val	Thr	Met	Met	Thr	Leu				
	290					295						300							
Leu	Thr	Ser	Met	Ala	Asp	Lys	Glu	Leu	Val	His	Met	Ile	Ala	Trp	Ala				
305					310						315				320				
Lys	Lys	Leu	Pro	Gly	Phe	Leu	Gln	Leu	Ser	Leu	His	Asp	Gln	Val	Leu				
					325					330					335				
Leu	Leu	Glu	Ser	Ser	Trp	Leu	Glu	Val	Leu	Met	Ile	Gly	Leu	Ile	Trp				
					340					345					350				
Arg	Ser	Ile	His	Cys	Pro	Gly	Lys	Leu	Ile	Phe	Ala	Gln	Asp	Leu	Ile				
	355						360						365						
Leu	Asp	Arg	Asn	Glu	Gly	Asp	Cys	Val	Glu	Gly	Met	Thr	Glu	Ile	Phe				
	370					375						380							
Asp	Met	Leu	Leu	Ala	Thr	Ala	Ser	Arg	Phe	Arg	Val	Leu	Lys	Leu	Lys				
385					390						395				400				
Pro	Glu	Glu	Phe	Val	Cys	Leu	Lys	Ala	Ile	Ile	Leu	Leu	Asn	Ser	Gly				
					405						410				415				
Ala	Phe	Ser	Phe	Cys	Thr	Gly	Thr	Met	Glu	Pro	Leu	His	Asn	Ser	Ala				
					420					425					430				
Ala	Val	Gln	Ser	Met	Leu	Asp	Thr	Ile	Thr	Asp	Ala	Leu	Ile	His	Tyr				
					435					440					445				
Ile	Ser	Gln	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ala	Gln	Glu	Gln	Ala	Arg	Arg	Gln	Ala				
	450						455						460						
Gln	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	His	Ile	Arg	His	Met	Ser	Asn	Lys	Gly				
465						470					475				480				
Met	Glu	His	Leu	Tyr	Ser	Met	Lys	Cys	Lys	Asn	Lys	Val	Pro	Leu	Tyr				
					485					490					495				
Asp	Leu	Leu	Leu	Glu	Met	Leu	Asp	Ala	His	Arg	Leu	His	His	Pro	Val				
					500					505					510				
Arg	Ala	Pro	Gln	Ser	Leu	Ser	Gln	Val	Asp	Arg	Asp	Pro	Pro	Ser	Thr				
					515					520					525				
Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ile	Ala	Pro	Gly	Ser	Ile	Ser	Ala	Ser	Arg				
					530					535					540				
Gly	Arg	Ile	Glu	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Pro	Phe	Ala	Pro	Ser	Val	Leu				
545						550					555				560				
Gln	Tyr	Gly	Gly	Ser	Arg	Pro	Asp	Cys	Thr	Pro	Ala	Leu	Gln	Asp					
					565					570					575				

&lt;211&gt; 1728

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryzias latipes*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)... (1728)

&lt;400&gt; 2

atg tac cct gaa gag agc cgg ggt tct gga ggg gtg gct gct gtg gac	48
Met Tyr Pro Glu Glu Ser Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala Ala Val Asp	
1 5 10 15	
ctt ttg gaa ggg acg tac gac tat gcc gcc ccc aac cct gcc acg act	96
Leu Leu Glu Gly Thr Tyr Asp Tyr Ala Ala Pro Asn Pro Ala Thr Thr	
20 25 30	
ccc ctt tac agc cag tcc agc acc ggc tac tac tct gct ccc ctg gaa	144
Pro Leu Tyr Ser Gln Ser Ser Thr Gly Tyr Tyr Ser Ala Pro Leu Glu	
35 40 45	
aca aac gga ccc ccc tca gaa ggc agt ctg cag tcc ctg ggc agt ggg	192
Thr Asn Gly Pro Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly	
50 55 60	
ccg acg agc cct ctg gtg ttt gtg ccc tcc agc ccc aga ctg agt ccc	240
Pro Thr Ser Pro Leu Val Phe Val Pro Ser Ser Pro Arg Leu Ser Pro	
65 70 75 80	
ttt atg cat cca ccc agc cac cac tat ctg gaa acc act tcc acg ccc	288
Phe Met His Pro Pro Ser His His Tyr Leu Glu Thr Thr Ser Thr Pro	
85 90 95	
gtt tac aga tcc agc cac cag gga gcc tcc agg gag gac cag tgc ggc	336
Val Tyr Arg Ser Ser His Gln Gly Ala Ser Arg Glu Asp Gln Cys Gly	
100 105 110	
tcc cgg gag gac acg tgc agc ctg ggg gag tta ggc gcc gga gcc ggg	384
Ser Arg Glu Asp Thr Cys Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ala Gly Ala Gly	
115 120 125	
gct ggg ggg ttt gag atg gcc aaa gac acg cgt ttc tgc gcc gtg tgc	432
Ala Gly Gly Phe Glu Met Ala Lys Asp Thr Arg Phe Cys Ala Val Cys	
130 135 140	
agc gac tac gcc tct ggg tac cac tat ggg gtg tgg tct tgt gag ggc	480
Ser Asp Tyr Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly	
145 150 155 160	
tgc aag gcc ttc ttc aag agg agc atc cag ggt cac aat gac tat atg	528
Cys Lys Ala Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met	
165 170 175	
tgc cca gcg acc aat cag tgc act att gac aga aat cga agg aag ggc	576
Cys Pro Ala Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg Asn Arg Arg Lys Gly	
180 185 190	
tgt cag gct tgt cgt ctt agg aag tgt tac gaa gtg gga atg atg aaa	624
Cys Gln Ala Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys	
195 200 205	
ggc ggt gtg cgc aag gac cgc att cgc att tta cgg cgt gac aaa cgg	672
Gly Gly Val Arg Lys Asp Arg Ile Arg Ile Leu Arg Arg Asp Lys Arg	

21	22
210	220
cgg aca ggc gtt ggt gat gga gac aag gtt gla aag ggt cag gag cat	720
Arg Thr Gly Val Gly Asp Gly Asp Lys Val Val Lys Gly Gln Glu His	
225	230
aaa acg gtg cat tat gat gga agg aaa cgc agc agc aca gga gga gga	768
Lys Thr Val His Tyr Asp Gly Arg Lys Arg Ser Ser Thr Gly Gly Gly	
245	250
gga gga gga gga gga gga aga ctg tct gtg acc agc ata cct cct gag	816
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Leu Ser Val Thr Ser Ile Pro Pro Glu	
260	265
cag gtg ctg ctc ctc ctt cag ggc gcc gag ccc ccg ata ctc tgc tgc	864
Gln Val Leu Leu Leu Leu Gln Gly Ala Glu Pro Pro Ile Leu Cys Ser	
275	280
cgt cag aag ttg agc cga ccg tac acc gag gtc acc atg atg acc ctg	912
Arg Gln Lys Leu Ser Arg Pro Tyr Thr Glu Val Thr Met Met Thr Leu	
290	295
ctc acc agc atg gca gac aag gag ctg gtc cac atg atc gcc tgg gcc	960
Leu Thr Ser Met Ala Asp Lys Glu Leu Val His Met Ile Ala Trp Ala	
305	310
aag aag ctc cca ggt ttt ctg cag ctg tcc ctg cac gat cag gtg ctg	1008
Lys Lys Leu Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Leu His Asp Gln Val Leu	
325	330
ctg ctg gag agc tgc tgg ctg gag gtg ctc atg atc ggc ctc att tgg	1056
Leu Leu Glu Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile Gly Leu Ile Trp	
340	345
agg tcc atc cac tgt ccc ggg aag ctc atc ttt gca caa gac ctc atc	1104
Arg Ser Ile His Cys Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala Gln Asp Leu Ile	
355	360
ctg gac agg aat gag gga gac tgc gtg gaa ggc atg acg gag atc ttc	1152
Leu Asp Arg Asn Glu Gly Asp Cys Val Glu Gly Met Thr Glu Ile Phe	
370	375
gac atg ctg ctg gcc act gct tcc cgc ttc cgt gtg ctc aaa ctc aaa	1200
Asp Met Leu Leu Ala Thr Ala Ser Arg Phe Arg Val Leu Lys Leu Lys	
385	390
cct gag gaa ttc gtc tgc ctc aaa gct att att tta ctc aac tcc ggt	1248
Pro Glu Glu Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly	
405	410
gct ttt tct ttc tgc acc ggc acc atg gag cca ctt cac aac agc gcg	1296
Ala Phe Ser Phe Cys Thr Gly Thr Met Glu Pro Leu His Asn Ser Ala	
420	425
gcg gtt cag agc atg ctg gac acc atc aca gac gca ctc att cat tac	1344
Ala Val Gln Ser Met Leu Asp Thr Ile Thr Asp Ala Leu Ile His Tyr	
435	440
atc agt cag tgc ggt tac ttg gcc cag gag cag gcg aga cgg cag gcc	1392
Ile Ser Gln Ser Gly Tyr Leu Ala Gln Glu Gln Ala Arg Arg Gln Ala	
450	455
cag ccg ctc ctg ctg ctc tcc cac atc agg cac atg agc aac aaa ggc	1440
Gln Pro Leu Leu Leu Leu Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly	
465	470
atg gag cac ctc tac agc atg aag tgc aag aac aaa gtc cct ctt tat	1488

23												24																																			
Met	Glu	His	Leu	Tyr	Ser	Met	Lys	Cys	Lys	Asn	Lys	Val	Pro	Leu	Tyr																																
485												490												495																							
gac ctc cta ctg gag atg ctc gat gcc cac cgc ctg cac cac ccc gtc																								1536																							
Asp	Leu	Leu	Leu	Glu	Met	Leu	Asp	Ala	His	Arg	Leu	His	His	Pro	Val																																
500												505												510																							
aga gcc ccc cag tcc ttg tcc caa gtc gac aga gac cct ccc tcc acc																								1584																							
Arg	Ala	Pro	Gln	Ser	Leu	Ser	Gln	Val	Asp	Arg	Asp	Pro	Pro	Ser	Thr																																
515												520												525																							
agc agc ggc ggg ggt gga atc gcl ccc ggt tct ata tca gca tct cga																								1632																							
Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ile	Ala	Pro	Gly	Ser	Ile	Ser	Ala	Ser	Arg																																
530												535												540																							
ggc aga atc gag agt ccg agc aga ggc ccc ttt gct ccc agt gtc ctt																								1680																							
Gly	Arg	Ile	Glu	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Pro	Phe	Ala	Pro	Ser	Val	Leu																																
545												550												555												560											
cag tat gga ggg tcg cgt cct gac tgc acc ccg gcc ctt caa gac tga																								1728																							
Gln	Tyr	Gly	Gly	Ser	Arg	Pro	Asp	Cys	Thr	Pro	Ala	Leu	Gln	Asp																																	
565												570												575																							

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 620

20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Oryzias lapites

&lt;400&gt; 1

Met	Ser	Lys	Arg	Gln	Ser	Ser	Val	Gln	Ile	Arg	Gln	Leu	Phe	Gly	Pro															
1		5				10				15																				
Ala	Leu	Arg	Ser	Arg	Ile	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Glu	Leu	Glu	Thr	Leu															
20				25				30																						
Ser	Pro	Pro	Arg	Leu	Ser	Pro	Arg	Asp	Pro	Leu	Gly	Asp	Met	Tyr	Pro															
35				40				45																						
Glu	Glu	Ser	Arg	Gly	Ser	Gly	Gly	Val	Ala	Ala	Val	Asp	Leu	Leu	Glu															
50		55				60																								
Gly	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Ala	Ala	Pro	Asn	Pro	Ala	Thr	Thr	Pro	Leu	Tyr															
65		70				75				80																				
Ser	Gln	Ser	Ser	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Pro	Leu	Glu	Thr	Asn	Gly															
85				90				95																						
Pro	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Leu	Gln	Ser	Leu	Gly	Ser	Gly	Pro	Thr	Ser															
100				105				110																						
Pro	Leu	Val	Phe	Val	Pro	Ser	Ser	Pro	Arg	Leu	Ser	Pro	Phe	Met	His															
115		120				125																								
Pro	Pro	Ser	His	His	Tyr	Leu	Glu	Thr	Thr	Ser	Thr	Pro	Val	Tyr	Arg															
130		135				140																								
Ser	Ser	His	Gln	Gly	Ala	Ser	Arg	Glu	Asp	Gln	Cys	Gly	Ser	Arg	Glu															
145		150				155				160																				
Asp	Thr	Cys	Ser	Leu	Gly	Glu	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly															
165				170				175																						
Phe	Glu	Met	Ala	Lys	Asp	Thr	Arg	Phe	Cys	Ala	Val	Cys	Ser	Asp	Tyr															
180		185				190																								
Ala	Ser	Gly	Tyr	His	Tyr	Gly	Val	Trp	Ser	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys	Ala															
195		200				205																								

25		26													
Phe	Phe	Lys	Arg	Ser	Ile	Gln	Gly	His	Asn	Asp	Tyr	Met	Cys	Pro	Ala
210						215					220				
Thr	Asn	Gln	Cys	Thr	Ile	Asp	Arg	Asn	Arg	Arg	Lys	Gly	Cys	Gln	Ala
225						230					235				240
Cys	Arg	Leu	Arg	Lys	Cys	Tyr	Glu	Val	Gly	Met	Met	Lys	Gly	Gly	Val
						245					250				255
Arg	Lys	Asp	Arg	Ile	Arg	Ile	Leu	Arg	Arg	Asp	Lys	Arg	Arg	Thr	Gly
						260					265				270
Val	Gly	Asp	Gly	Asp	Lys	Val	Val	Lys	Gly	Gln	Glu	His	Lys	Thr	Val
						275					280				285
His	Tyr	Asp	Gly	Arg	Lys	Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
						290									300
Gly	Gly	Gly	Arg	Leu	Ser	Val	Thr	Ser	Ile	Pro	Pro	Glu	Gln	Val	Leu
305						310					315				320
Leu	Leu	Leu	Gln	Gly	Ala	Glu	Pro	Pro	Ile	Leu	Cys	Ser	Arg	Gln	Lys
						325					330				335
Leu	Ser	Arg	Pro	Tyr	Thr	Glu	Val	Thr	Met	Met	Thr	Leu	Leu	Thr	Ser
						340					345				350
Met	Ala	Asp	Lys	Glu	Leu	Val	His	Met	Ile	Ala	Trp	Ala	Lys	Lys	Leu
						355					360				365
Pro	Gly	Phe	Leu	Gln	Leu	Ser	Leu	His	Asp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Glu
						370					375				380
Ser	Ser	Trp	Leu	Glu	Val	Leu	Met	Ile	Gly	Leu	Ile	Trp	Arg	Ser	Ile
385						390					395				400
His	Cys	Pro	Gly	Lys	Leu	Ile	Phe	Ala	Gln	Asp	Leu	Ile	Leu	Asp	Arg
						405					410				415
Asn	Glu	Gly	Asp	Cys	Val	Glu	Gly	Met	Thr	Glu	Ile	Phe	Asp	Met	Leu
						420					425				430
Leu	Ala	Thr	Ala	Ser	Arg	Phe	Arg	Val	Leu	Lys	Leu	Lys	Pro	Glu	Glu
						435					440				445
Phe	Val	Cys	Leu	Lys	Ala	Ile	Ile	Leu	Leu	Asn	Ser	Gly	Ala	Phe	Ser
						450					455				460
Phe	Cys	Thr	Gly	Thr	Met	Glu	Pro	Leu	His	Asn	Ser	Ala	Ala	Val	Gln
465						470					475				480
Ser	Met	Leu	Asp	Thr	Ile	Thr	Asp	Ala	Leu	Ile	His	Tyr	Ile	Ser	Gln
						485					490				495
Ser	Gly	Tyr	Leu	Ala	Gln	Glu	Gln	Ala	Arg	Arg	Gln	Ala	Gln	Pro	Leu
						500					505				510
Leu	Leu	Leu	Ser	His	Ile	Arg	His	Met	Ser	Asn	Lys	Gly	Met	Glu	His
						515					520				525
Leu	Tyr	Ser	Met	Lys	Cys	Lys	Asn	Lys	Val	Pro	Leu	Tyr	Asp	Leu	Leu
						530					535				540
Leu	Glu	Met	Leu	Asp	Ala	His	Arg	Leu	His	His	Pro	Val	Arg	Ala	Pro
545						550					555				560
Gln	Ser	Leu	Ser	Gln	Val	Asp	Arg	Asp	Pro	Pro	Ser	Thr	Ser	Ser	Gly
						565					570				575
Gly	Gly	Gly	Ile	Ala	Pro	Gly	Ser	Ile	Ser	Ala	Ser	Arg	Gly	Arg	Ile
						580					585				590
Glu	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Pro	Phe	Ala	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Tyr	Gly
						595					600				605

27		28
Gly Ser Arg Pro Asp Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp		
610	615	
<210> 2		
<211> 1863		
<212> DNA		
<213> Oryzias latipes		
<220>		
<221> CDS	10	
<222> (1)... (1863)		
<400> 2		
aig agl aag aga cag agc tgc gtg cag atc agg cag ctg ttc gga cca	48	
Met Ser Lys Arg Gln Ser Ser Val Gln Ile Arg Gln Leu Phe Gly Pro		
1 5 10 15		
gca ctc aga tcc agg atc agc cca gcc tcc tca gag ctg gag acc ctc	96	
Ala Leu Arg Ser Arg Ile Ser Pro Ala Ser Ser Glu Leu Glu Thr Leu		
20 25 30		
tcc cca cct cgc ctc tgc ccc cgt gac ccc ctc ggt gac atg tac cct	144	
Ser Pro Pro Arg Leu Ser Pro Arg Asp Pro Leu Gly Asp Met Tyr Pro		
35 40 45		
gaa gag agc cgg ggt tct gga ggg gtg gct gct gtg gac ctt ttg gaa	192	
Glu Glu Ser Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala Ala Val Asp Leu Leu Glu		
50 55 60		
ggg acg tac gac tat gcc gcc ccc aac cct gcc acg act ccc ctt tac	240	
Gly Thr Tyr Asp Tyr Ala Ala Pro Asn Pro Ala Thr Thr Pro Leu Tyr		
65 70 75 80		
agc cag tcc agc acc ggc tac tac tct gct ccc ctg gaa aca aac gga	288	
Ser Gln Ser Ser Thr Gly Tyr Tyr Ser Ala Pro Leu Glu Thr Asn Gly		
85 90 95		
ccc ccc tca gaa ggc agl ctg cag tcc ctg ggc agt ggg ccg acg agc	336	
Pro Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly Pro Thr Ser		
100 105 110		
cct ctg glg ttt gtg ccc tcc agc ccc aga ctc agt ccc ttt atg cat	384	
Pro Leu Val Phe Val Pro Ser Ser Pro Arg Leu Ser Pro Phe Met His		
115 120 125		
cca ccc agc cac cac tat ctg gaa acc act tcc acg ccc gtt tac aga	432	
Pro Pro Ser His His Tyr Leu Glu Thr Thr Ser Thr Pro Val Tyr Arg		
130 135 140		
tcc agc cac cag gga gcc tcc agg gag gac cag tgc gcc tcc cgg gag	480	
Ser Ser His Gln Gly Ala Ser Arg Glu Asp Gln Cys Gly Ser Arg Glu		
145 150 155 160		
gac acg tgc agc ctg ggg gag tta ggc gcc gga gcc ggg gct ggg ggg	528	
Asp Thr Cys Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly		
165 170 175		
ttt gag atg gcc aaa gac acg cgt ttc tgc gcc gtg tgc agc gac tac	576	
Phe Glu Met Ala Lys Asp Thr Arg Phe Cys Ala Val Cys Ser Asp Tyr		
180 185 190		
gcc tct ggg tac cac tat ggg gtg tgg tct tgt gag gcc tgc aag gcc	624	



29	30
Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala	
195	200 205
ttc ttc aag agg agc atc cag ggt cac aat gac tat atg tgc cca gcg	672
Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala	
210	215 220
acc aat cag tgc act att gac aga aat cga agg aag ggc tgt cag gct	720
Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg Asn Arg Arg Lys Gly Cys Gln Ala	
225	230 235 240
tgt cgt ctt agg aag tgt tac gaa gtg gga atg atg aaa ggc ggt gtg	768
Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Val	
245	250 255
cgc aag gac cgc att cgc att tta cgg cgt gac aaa cgg cgg aca ggc	816
Arg Lys Asp Arg Ile Arg Ile Leu Arg Arg Asp Lys Arg Arg Thr Gly	
260	265 270
gtt ggt gat gga gac aag gtt gta aag ggt cag gag cat aaa acg glg	864
Val Gly Asp Gly Asp Lys Val Val Lys Gly Gln Glu His Lys Thr Val	
275	280 285
cat tat gat gga agg aaa cgc agc agc aca gga gga gga gga gga gga	912
His Tyr Asp Gly Arg Lys Arg Ser Ser Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly	
290	295 300
gga gga gga aga ctg tct gtg acc agc ata cct cct gag cag gtg ctg	960
Gly Gly Gly Arg Leu Ser Val Thr Ser Ile Pro Pro Glu Gln Val Leu	
305	310 315 320
ctc ctc ctt cag ggc gcc gag ccc ccg ata ctc tgc tgc cgt cag aag	1008
Leu Leu Leu Gln Gly Ala Glu Pro Pro Ile Leu Cys Ser Arg Gln Lys	
325	330 335
ttg agc cga ccg tac acc gag gtc acc atg atg acc ctg ctc acc agc	1056
Leu Ser Arg Pro Tyr Thr Glu Val Thr Met Met Thr Leu Leu Thr Ser	
340	345 350
atg gca gac aag gag ctg gtc cac atg atc gcc tgg gcc aag aag ctc	1104
Met Ala Asp Lys Glu Leu Val His Met Ile Ala Trp Ala Lys Lys Leu	
355	360 365
cca ggt ttt ctg cag ctg tcc ctg cac gat cag gtg ctg ctg ctg gag	1152
Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Leu His Asp Gln Val Leu Leu Leu Glu	
370	375 380
agc tgc tgg ctg gag gtg ctc atg atc ggc ctc att tgg agg tcc atc	1200
Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile Gly Leu Ile Trp Arg Ser Ile	
385	390 395 400
cac tgt ccc ggg aag ctc atc ttt gca caa gac ctc atc ctg gac agg	1248
His Cys Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala Gln Asp Leu Ile Leu Asp Arg	
405	410 415
aal gag gga gac tgc gtg gaa ggc atg acg gag atc ttc gac atg ctg	1296
Asn Glu Gly Asp Cys Val Glu Gly Met Thr Glu Ile Phe Asp Met Leu	
420	425 430
ctg gcc act gct tcc cgc ttc cgt gtg ctc aaa ctc aaa cct gag gaa	1344
Leu Ala Thr Ala Ser Arg Phe Arg Val Leu Lys Leu Lys Pro Glu Glu	
435	440 445
ttc gtc tgc ctc aaa gct att att tta ctc aac tcc ggt gct ttt tct	1392
Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Ala Phe Ser	
450	455 460

31	32
ttc tgc acc ggc acc atg gag cca ctt cac aac agc gcg gcg gtt cag	1440
Phe Cys Thr Gly Thr Met Glu Pro Leu His Asn Ser Ala Ala Val Gln	
465 470 475 480	
agc atg ctg gac acc atc aca gac gca ctc att cat tac atc agt cag	1488
Ser Met Leu Asp Thr Ile Thr Asp Ala Leu Ile His Tyr Ile Ser Gln	
485 490 495	
tcg ggt tac ttg gcc cag gag cag gcg aga cgg cag gcc cag ccg ctc	1536
Ser Gly Tyr Leu Ala Gln Glu Gln Ala Arg Arg Gln Ala Gln Pro Leu	
500 505 510	
ctg ctg ctc tcc cac atc agg cac atg agc aac aaa ggc atg gag cac	1584
Leu Leu Leu Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His	
515 520 525	
ctc tac agc atg aag tgc aag aac aaa gtc cct ctt tat gac ctc cta	1632
Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn Lys Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu	
530 535 540	
ctg gag atg ctc gat gcc cac cgc ctg cac cac ccc gtc aga gcc ccc	1680
Leu Glu Met Leu Asp Ala His Arg Leu His His Pro Val Arg Ala Pro	
545 550 555 560	
cag tcc ttg tcc caa gtc gac aga gac cct ccc tcc acc agc agc ggc	1728
Gln Ser Leu Ser Gln Val Asp Arg Asp Pro Pro Ser Thr Ser Ser Gly	
565 570 575	
ggg ggt gga atc gct ccc ggt tct ata tca gca tct cga ggc aga atc	1776
Gly Gly Gly Ile Ala Pro Gly Ser Ile Ser Ala Ser Arg Gly Arg Ile	
580 585 590	
gag agt ccg agc aga ggc ccc ttt gct ccc agt gtc ctt cag tat gga	1824
Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Phe Ala Pro Ser Val Leu Gln Tyr Gly	
595 600 605	
ggg tcg cgt cct gac tgc acc ccg gcc ctt caa gac tga	1863
Gly Ser Arg Pro Asp Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp	
610 615 620	

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のエストロジェンレセプター遺伝子を発現させるための発現ベクターの構築過程を示す図である。

【図2】本発明のエストロジェンレセプター遺伝子を発現させるための発現ベクターRSV-ERの構造を示す図である。pRC/RSVは構築に用いたベクターである。ERは本発明のエストロジェン遺伝子を、RSV LTRはRSVプロモーターを、pSV40はSV40プロモーターを、Neomycinはネオマイシン耐性遺伝子をそれぞれ示す。

【図3】エストロジェン応答配列とレポーター遺伝子とを含むレポータープラスミドERE-tK-pGL（図中ではERE-pGLと表示）の構築過程を示す図である。

【図4】エストロジェン応答配列とレポーター遺伝子とを含むレポータープラスミドERE-tK-pGLの構造を示す図である。4XEREはエストロジェン応答配列が4個連結された配列を意味し、tK promoterはtKプロモーターを、Amp<sup>r</sup>アンピシリン耐性遺伝子を示す。

【図5】レポーターアッセイ用の細胞を調製するためのトランスフェクションの条件を検討した結果を示す図で

ある。上段の図は、トランスフェクション試薬にリポフェクチンを使用した場合、下段の図はリポフェクトアミンを使用した場合の結果を示す。

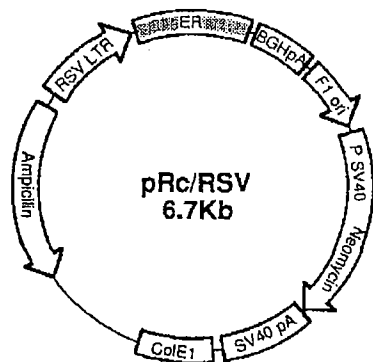
【図6】レポーターアッセイ用の細胞を調製するためのトランスフェクションにおいて、添加するトランスフェクション試薬の量を検討した結果を示す図である。上段の図は、リポフェクチンを使用した場合、下段の図はリポフェクトアミンを使用した場合の結果を示す。

【図7】レポーターアッセイ用の細胞を調製するためのトランスフェクションにおいて、添加するプラスミドの量を検討した結果を示す図である。上段の図は、リポフェクチンを使用した場合、下段の図はリポフェクトアミンを使用した場合の結果を示す。

【図8】レポーターアッセイにおける $\beta$ -エストラジオールのエストロジェンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25 $\mu$ gのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.15 $\mu$ gのレポータープラスミドERE5-tK-pGL、および、0.1 $\mu$ gのコントロールレポータープラスミドpRL-tKを導入した細胞を試験に用いた。上段の図は、トランスフェクション試薬にリポフェクチ

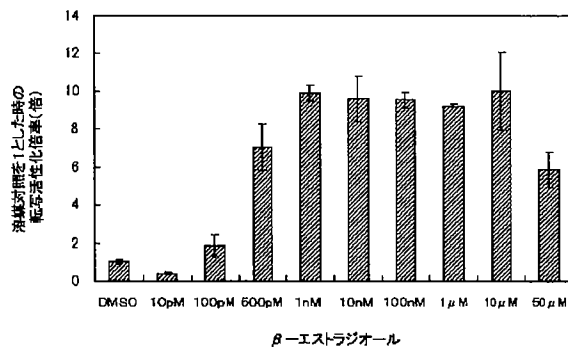
【図12】レポーターアッセイにおける酢酸トリブチルすずのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25  $\mu\text{g}$ のレセプター発現ベクターRSV-ER、0.15  $\mu\text{g}$ のレポータープラスミドERE5-tK-pGL、および、0.1  $\mu\text{g}$ のコントロールレポーター

【図2】

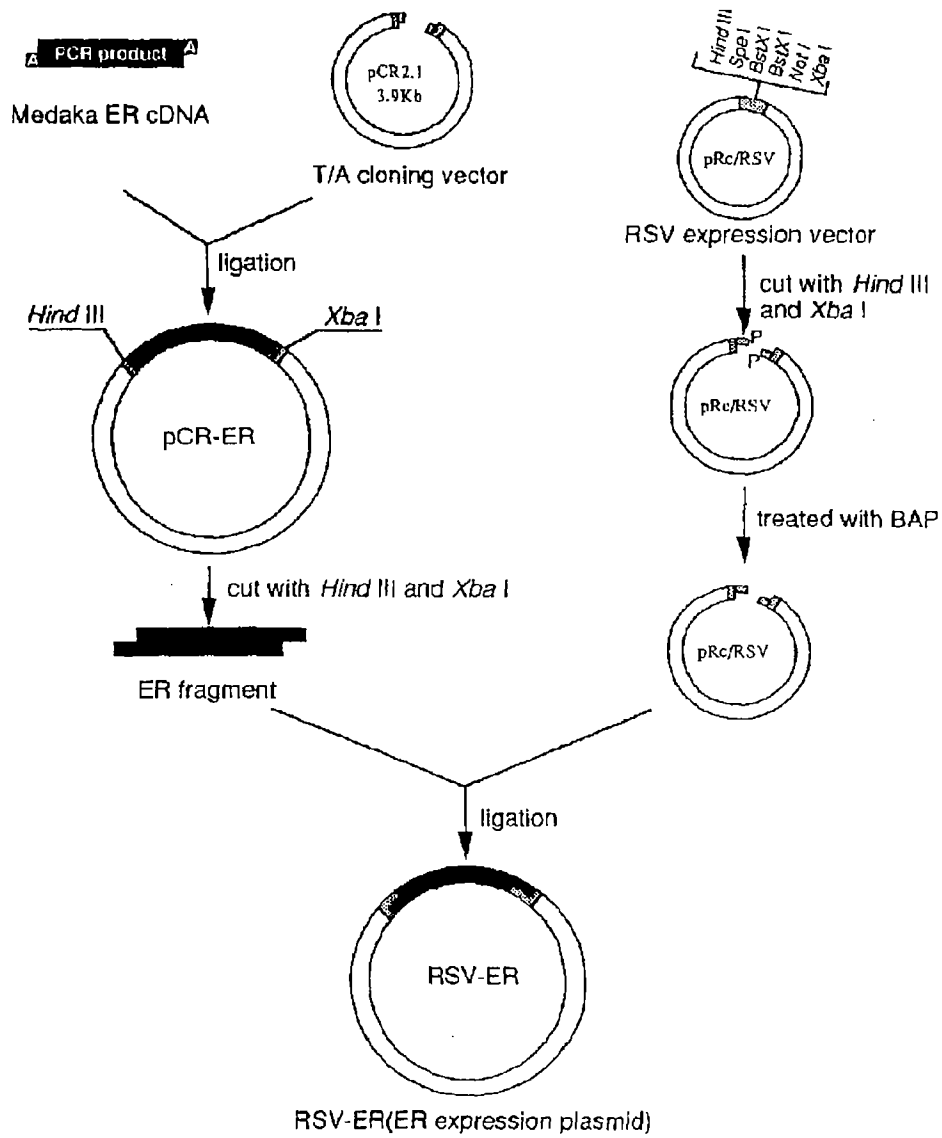


【図14】レポーターアッセイにおける各種化合物のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25  $\mu\text{g}$ のレセプター発現ベクター-RSV-ER、0.15  $\mu\text{g}$ のレポータープラスミドERE5-1K-pGL、および、0.1  $\mu\text{g}$ のコントロールレポータープラスミドpRL-tKをリポフェクタミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。E2は終濃度500pMの $\beta$ -エストラジオールが添加された系を、Tisは終濃度50  $\mu\text{M}$ の酢酸トリブチルすずが添加された系を、BisAは終濃度50  $\mu\text{M}$ のビスフェノールAが添加された系を、Di-2は終濃度50  $\mu\text{M}$ のフタル酸ジ-2-エチルヘキシルが添加された系を、Nonylは終濃度50  $\mu\text{M}$ のノニルフェノールが添加された系を示す。顕微鏡観察により判定された死亡細胞率は、酢酸トリブチルすずが添加された系において90%以上、ビスフェノールAが添加された系において0%、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルが添加された系において90%以上、ノニルフェノールが添加された系において40%前後であった。

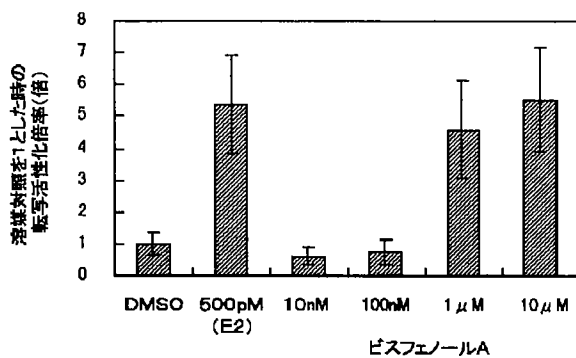
【图 9】



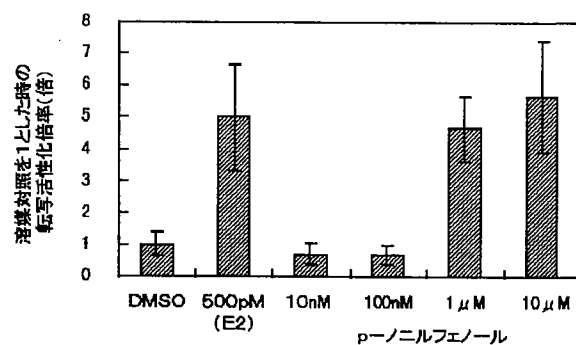
【図1】



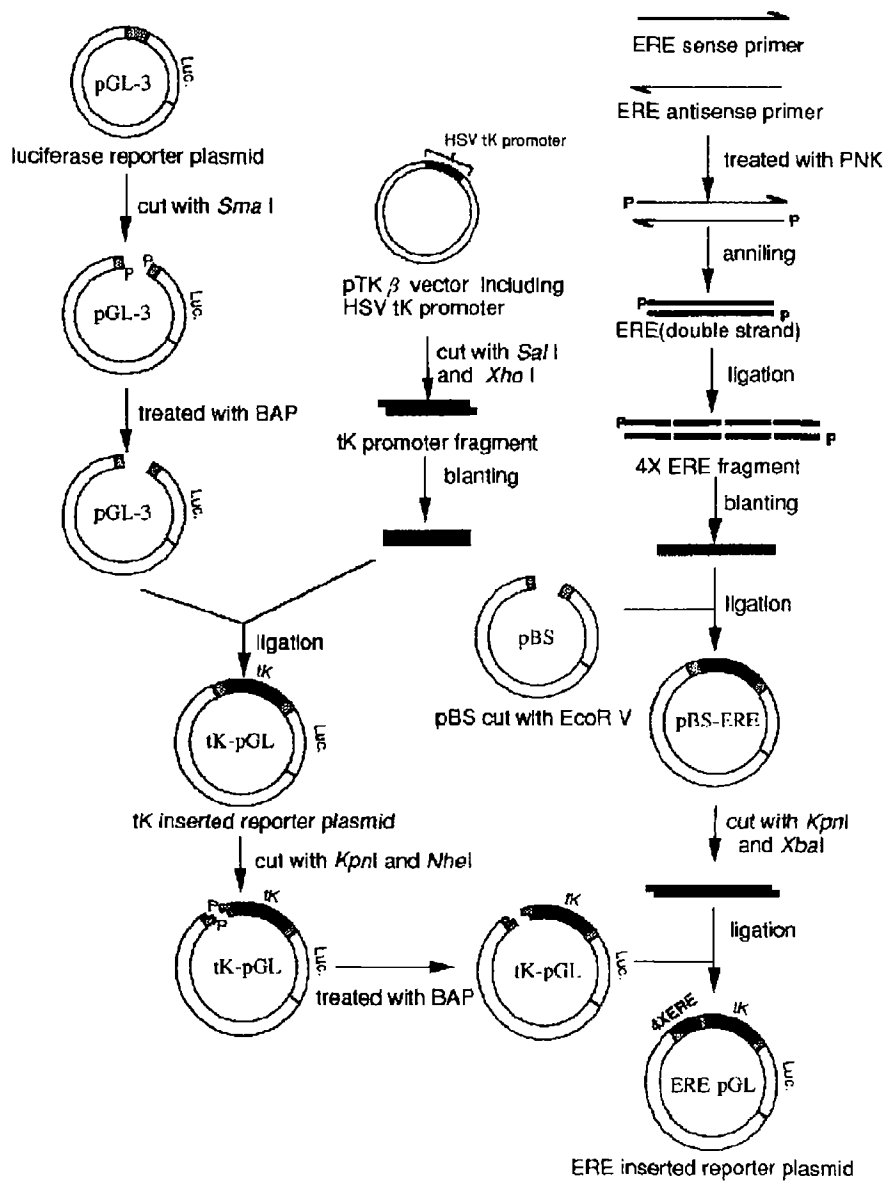
【図10】



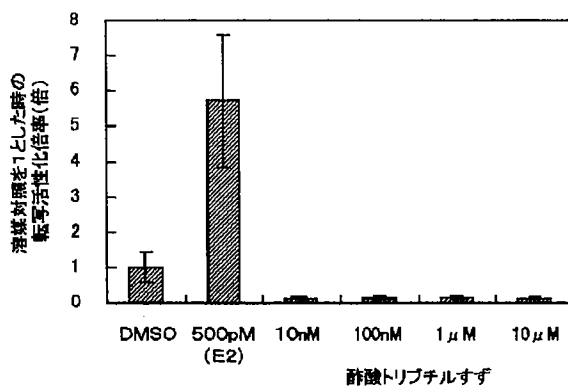
【図11】



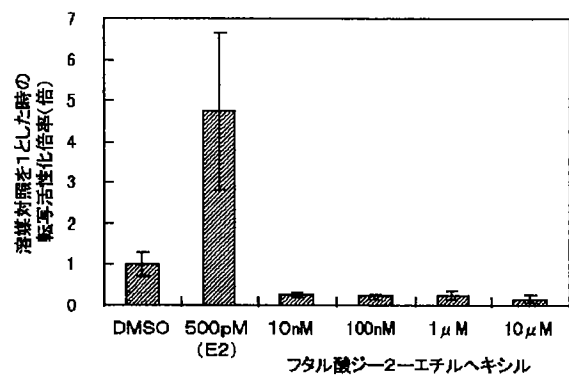
【図 3】



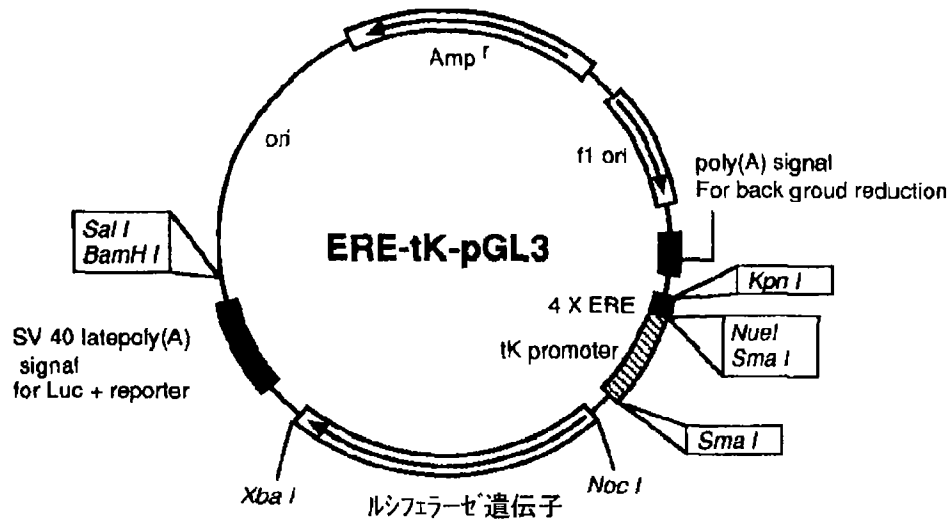
【図 1 2】



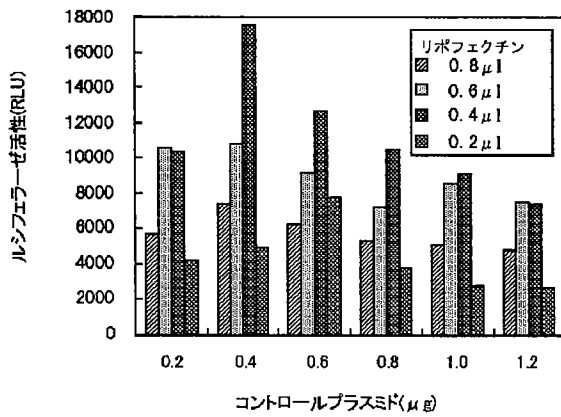
【図 1 3】



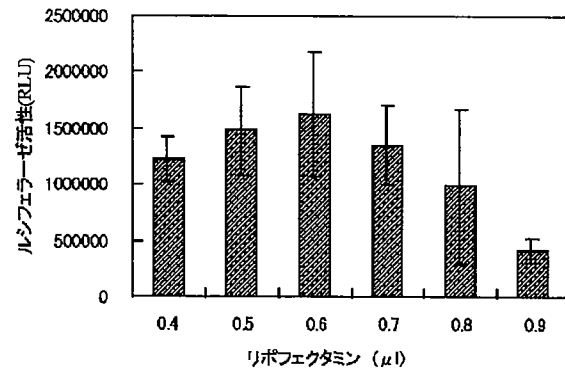
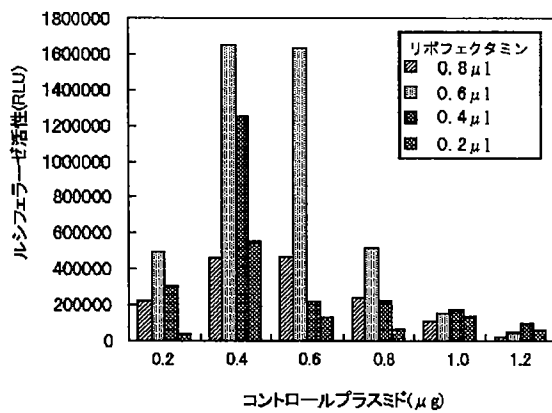
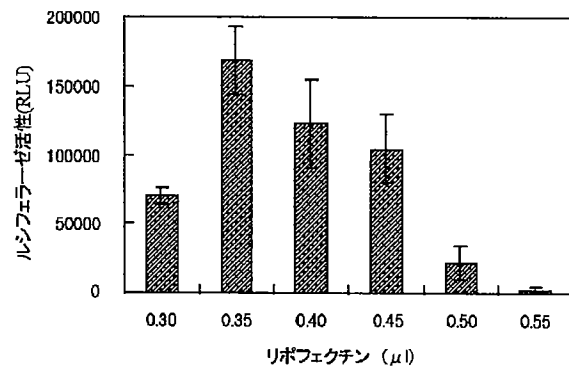
【図 4】



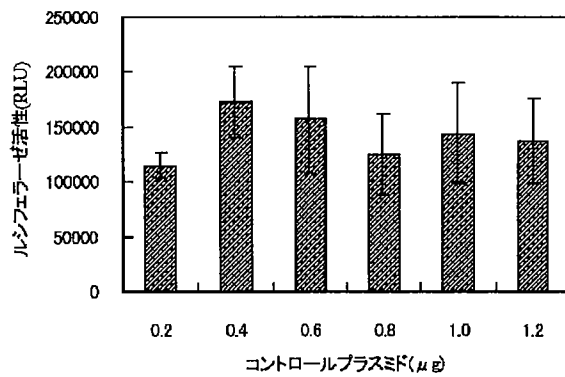
【図 5】



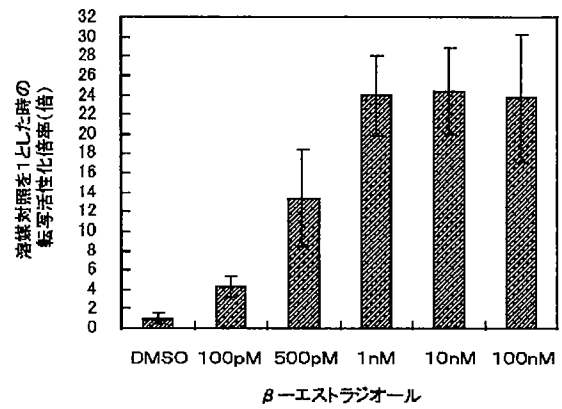
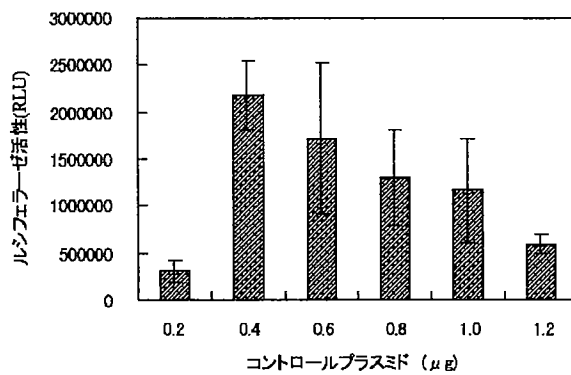
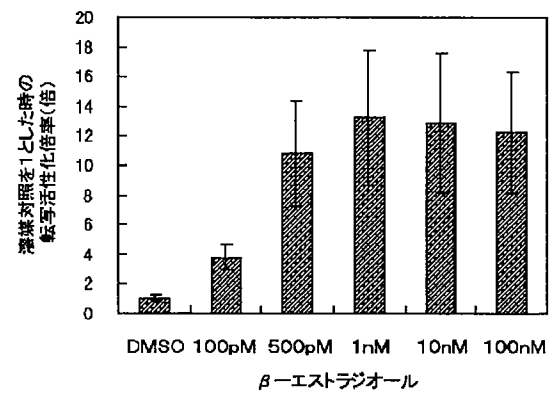
【図 6】



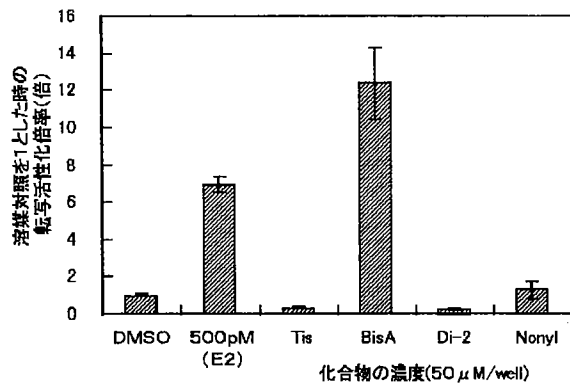
【図 7】



【図 8】



【図 14】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>  
 //(C 1 2 N 15/09  
 C 1 2 R 1:91)  
 (C 1 2 P 21/02  
 C 1 2 R 1:91)

識別記号  
 Z N A

F I

テ-マ-ド (参考)

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA17 AA20 BA63 DA02  
EA04 FA02 FA10 GA13 HA03  
HA11  
4B063 QA01 QQ22 QQ61 QQ75 QQ91  
QQ94 QR33 QR60 QR77 QR80  
QS36 QX02  
4B064 AG20 CA10 CA19 CC24 DA13  
DA16  
4B065 AA90Y AA93X AB01 AC14  
BA05 CA46  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA52  
DA50 EA50 FA72 FA74 HA06